**Introgression du retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine de *Gossypium* *sturtianum* Willis chez la principale espèce de cotonnier cultivé**

**(G. *hirsutum* L.).**

Mergeai Guy1, Baudoin Jean-Pierre1, du Jardin Patrick2, Vroh Bi Irié1,2.

1 Unité de Phytotechnie des Régions intertropicales

2 Unité de Biologie végétale

Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, B-5030 Gembloux,

tél. : +32-81-622144, fax : +32-81-614544, courrier électronique : mergeai@fsagx.ac.be

**Introduction**

Chez toutes les espèces de cotonnier, les glandes à gossypol ou glandes à pigments sont des petites cavités où s'accumulent des déchets du métabolisme de la plante. On y trouve essentiellement du gossypol et différents autres terpénoïdes. Ces glandes sont toxiques pour les insectes et constituent un moyen de défense naturel du cotonnier contre ses ravageurs (Altman *et al*., 1990). Le contenu de ces glandes est également très toxiques pour tous les animaux monogastriques, y compris pour l'homme. La présence de gossypol dans la graine limite l'exploitation du haut potentiel alimentaire du cotonnier. Les amandes des graines de cotonnier contiennent en moyenne 20 % d'huile comestible et plus de 40 % de protéines dont la qualité nutritive est équivalente à celle des protéines du soja. L'huile et les tourteaux, produits par pression des amandes, contiennent des quantités importantes de gossypol dont l'élimination exige la mise en oeuvre de procédés industriels qui altèrent la qualité des protéines et augmentent les coûts de production.

Dans la nature, seuls certains cotonniers diploides sauvages australiens présentent des glandes à gossypol partout sauf dans leurs graines (Fryxell, 1965; Brubacker *et al*., 1996). Chez ces cotonniers, l'apparition des glandes à gossypol se produit après la germination. L'introgression de ce retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine chez le cotonnier cultivé permettrait de le transformer en une véritable plante vivrière tout en préservant un de ses moyens de défense naturel contre les insectes. Cette introgression constitue l'objectif majeur de nos recherches.

**Matériel et méthode**

Deux hybrides trispécifiques incluant *Gossypium sturtianum* Willis (2n = 2x = 26, génome C1) et *G. hirsutum* L. (2n = 4x = 52, génome (AD)1) ont été créés en utilisant respectivement *G. thurberi* Torado (2n = 2x = 26, génome D1) et *G. raimondii* Ulbrich (2n = 2x = 26, génome D5) comme espèces pont (Mergeai *et al*., 1995). Ces deux hybrides trispécifiques sont identifiés par les initiales TSH (*G.thurberi* x *G.sturtianum* x *G. hirsutum*) et HRS (*G.hirsutum* x *G.raimondii* x *G. sturtianum*). Environ deux cents rétrocroisements ont été réalisés pour chaque hybride trispécifique au moyen de deux variétés de *G. hirsutum* originaires du Congo-Kinshasa (C2, NC8). Les 100 premiers croisements ont été effectués sans application de régulateurs de croissance et les 100 croisements suivants ont été réalisés en utilisant le mélange d’hormones proposé par Altman (1988) : 100 mg/l d’acide Naphtoxyacétique + 50 mg/l d’acide gibberellique. La majorité des embryons hybrides ont été cultivés sur le milieu de Stewart et Hsu (1977) de manière à garantir leur bonne germination et un bon démarrage des plantules. La densité de glandes à gossypol sur les graines produites par rétrocroisement a été évaluée en utilisant une échelle variant de 0 pour les graines totalement dépourvues de glande à 10 pour les graines dont la densité de glandes était semblable à celle de l'espèce cultivée. L’évaluation de la densité en glandes à gossypol a été réalisée après élimination des téguments et trempage de l’amande pendant une heure dans de l’eau stérile. Les analyses méiotiques des matériels produits ont été réalisées sur des boutons floraux fixés pendant 72 heures dans la solution de Carnoy (éthanol 95%:chloroforme:acide acétique glacial, 6:3:1 v:v:v). Au moins 26 cellules mère du pollen ont été analysées pour chaque génotype.

Parallèlement aux travaux d’hybridation interspécifique, une technique de sélection du cotonnier assistée par marqueurs moléculaires de l’ADN nucléaire (RAPD) a été développée afin de faciliter la restauration de l’équilibre génétique des matériels introgressés. Ces travaux ont porté sur l’amélioration de la technique CTAB d’extraction de l’ADN du cotonnier (Vroh Bi *et al*., 1996), sur l’optimisation des réactions RAPD (Vroh bi *et al*., 1997) et sur l’identification de marqueurs spécifiques des parents de chaque hybride trispécifique (Mergeai *et al*. 1997).

**Résultats et discussion**

Les deux hybrides trispécifiques sont totalement autostériles et les premières tentatives de rétrocroisements n’ont pratiquement donné aucun résultat. Sans application de régulateurs de croissance, aucune graine n'a pu être produite par l'hybride TSH et il a fallu réaliser environ 100 croisements pour obtenir une graine à partir de l'hybride HRS. Grâce à l'application de régulateurs de croissance, le taux de réussite moyen est passé de 0 à 15 graines pour 100 croisements pour l'hybride TSH et de 1 à 20 graines pour 100 croisements pour l'hybride HRS.

L’application de régulateurs de croissance a permis de produire 41 graines BC1 (17 à partir de HRS et 24 à partir de TSH). Parmi ces 41 graines, 6 étaient totalement démunies de glandes tandis que la distribution de fréquences des densités de glandes observées chez le reste des graines présentait un aspect de cloche asymétrique : les classes de densité de glandes intermédiaires étant les plus représentées.

Sur les six graines totalement démunies de glandes que nous avons produites, une seule a donné une plante adulte dont la densité de glandes était totalement normale. Pour obtenir cette dernière, il a été nécessaire de cultiver la graine *in vitro* pendant 2 semaines et de greffer la plantule obtenue sur un porte-greffe de l'espèce *G. hirsutum*. Toutes les autres graines sans glandes produites par rétrocroisement des hybrides trispécifiques n'ont pas germé ou ont dégénéré après quelques jours de culture *in vitro*. La seule plante que nous avons obtenue à partir d'une graine totalement démunie de glandes (TSH x NC8/5) fleurit abondamment mais est tout à fait autostérile.

L’analyse de la méiose des hybrides trispécifiques et de leur descendance confirme le bien-fondé de la stratégie d’introgression suivie. Les deux hybrides trispécifiques sont euploïdes (2n = 4x = 52) et les nombres d’associations bi- et multivalentes chez TSH (15.34 ± 0.49 II + 0.93 ± 0.17 III + 0.69 ± 0.14 IV + 0.26 ± 0.1 VI) et chez HRS (17.03 ± 0.49 II + 0.82 ± 0.19 III + 0.15 ± 0.07 IV + 0,07 ± 0.05 VI) sont nettement plus hauts que ce qui avait été observé par Shujing et Biling (1993) chez l’hybride trispécifique *G.aroreum* L.x *G.bickii* Prokh x *G.hirsutum* (4,54 II + 0,57 III + 0,41 IV). Dans ce dernier hybride, *G. bickii* (2n = 2x = 26, génome G1) constituait l’espèce donneuse du caractère recherché et *G. aboreum* (2n = 2x = 26, génome A2), espèce diploide asiatique, était utilisée comme pont.

Le génotype introgressé est également euploïde (2n = 4x = 52). L’expression du caractère recherché chez ce cotonnier tétraploide peut être due aux chromosomes de *G. sturtianum* encore présents chez celui-ci ou à des recombinaisons entre les chromosomes du génome C porteurs des facteurs de répression et ceux des sous-génomes Ah et Dh du cotonnier cultivé.

Les hauts taux d’appariement (20.61 ± 0.57 II + 0.69 ± 0.17 III + 0.77 ± 0.15 IV) et de formation de chiasmas (50.38 ± 0.63) observés chez le génotype TSHxNC8/5 permettent d’espérer le passage du caractère recherché aux générations suivantes et un retour assez rapide vers une forme de cotonnier génétiquement équilibrée dont les graines seront dépourvues de glandes à gossypol alors que sa partie aérienne conservera cet important moyen de défense naturel contre les insectes.

Afin de faciliter la restauration de l’équilibre génétique des matériels introgressés, nous avons développé, parallèlement aux travaux d’hybridation interspécifiques, une technique de sélection du cotonnier assistée par marqueurs moléculaires de l’ADN nucléaire. Cette technique se base sur l’amélioration de la méthode classique d’extraction de l’ADN au CTAB de Murray et Thompson (1980). La principale modification apportée à la méthode standard concerne l’ajout de charbon de bois activé pendant l’incubation des extraits de tissus végétaux. Cette modification originale a permis une amélioration significative de l’amplification PCR de l’ADN extrait chez le cotonnier et chez d’autres plantes récalcitrantes comme le caféier, le bananier, l’hévéa et le manioc (Vroh bi *et al*., 1996).

A partir d’ADN extrait des différentes espèces de cotonnier intervenant dans la création des hybrides TSH et HRS nous avons optimisé les paramètres intervenant dans les réactions RAPD (Vroh bi *et al*., 1997) . Tous les facteurs testés ont influencé le résultat final mais la concentration d’ADN, du chlorure de magnésium, des désoxynucléotides triphosphates et la température de dénaturation se sont avérés être les paramètres les plus importants. Les différents facteurs envisagés ont été optimisés par réajustements successifs en partant des conditions RAPD standards et en considérant les recommandations des fournisseurs des différents constituants de la réaction.

Au total, 375 bandes RAPD ont été générées par 30 amorces décamères (Mergeai *et al*., 1997). Parmi ces bandes, seulement 36 (9,6 %) se retrouvent chez tous les parents des hybrides trispécifiques. Les 339 (90,4 %) autres fragments sont polymorphes. Le tableau 1 résume les résultats obtenus concernant l’identification de marqueurs RAPD spécifiques des espèces diploïdes sauvages constitutives des hybrides TSH et HRS et leur transmission dans ces hybrides.

Tableau 1 : Transmission des marqueurs RAPD spécifiques des cotonniers diploïdes chez les hybrides trispécifiques

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Génotypes testés | Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez le génotype parental | Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez TSH | Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez HRS |
| *G. sturtianum* | 49 | 18\* | 20\* |
| *G. raimondii* | 12 | 0 | 4 |
| *G. thurberi* | 13 | 4 | 0 |

\* Les deux hybrides trispécifiques partagent 18 bandes caractéristiques de *G. sturtianum*.

L’absence systématique de certains marqueurs spécifiques des espèces sauvages chez les hybrides trispécifiques peut s’expliquer par la présence d’un seul complément de chacune des 13 paires de chromosomes des espèces diploïdes sauvages et par l’existence d’interférences entre certains fragments d’ADN au moment de l’amplification (Heun et Helentjaris, 1993). Pour limiter ce risque de « compétition » entre fragments lors de l’amplification, nous n’avons pris en considération que des bandes bien nettes qui étaient à la fois présentes chez l’espèce parentale et chez les hybrides trispécifiques. Au total, 22 marqueurs de ce type ont été identifiés chez *G. sturtianum* contre 4 marqueurs pour *G. raimondii* et *G. thurberi*. Etant donné la grande proximité phylétique qui existe entre les espèces sauvages diploïdes du génome D (*G*. *thurberi* et *G. raimondii*) et le sous-génome Dh de *G. hirsutum*, il n’est pas surprenant d’observer pour elles un plus faible nombre de marqueurs RAPD spécifiques que pour *G. sturtianum* qui appartient à un génome nettement plus distant.

Ces marqueurs RAPD spécifiques ont été utilisés pour évaluer l’introgression de segments d’ADN des espèces diploïdes sauvages chez les plantes obtenues en rétrocroisant les hybrides trispécifiques par des variétés de *G. hirsutum*. Tous les marqueurs RAPD spécifiques de *G. sturtianum* ont été retrouvés parmi les BC1 obtenus à partir de TSH et HRS et le nombre de marqueurs spécifiques observés par plante variait de 7 à 20 (avec une moyenne de 13). Ces marqueurs spécifiques de *G. sturtianum* seront utilisés pour sélectionner, à chaque génération de rétrocroisement, les plantes introgressées génétiquement les plus proches du parent récurrent, c’est-à-dire celles qui présenteront le moins de marqueurs spécifiques de l’espèce sauvage donneuse du caractère, de manière à accélérer le retour vers une forme bien équilibrée.

**Bibliographie**

Altman DW (1988). Exogenous hormone applications at pollination for in vitro and *in vivo* production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Rep*. **7**,257-261.

Altman DW, Stipanovic RD, Bell AA (1990). Terpenoids in foliar pigment glands of A, D, and AD genome cottons: Introgression potential for pest resistance. *J. Hered*. **81**, 447-454.

Brubaker CL, Benson CG, Miller C, Leach DN (1996). Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. Austr. J. Bot. **44**, 601-612.

Fryxell, PA (1965). A revision of the Australian species of *Gossypium* with observation on the occurrence of *Thespesia* in Australia. *Austr. J. Bot*. **13**, 71-102.

Heun M, Helentjaris T (1993) Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. Theor Appl Genet **85** : 961-968

Mergeai G, Vroh Bi I, Du Jardin P, Baudoin JP (1995). Introgression of glanded-plant and glandless-seed trait from *G. sturtianum* Willis into tetraploid cotton plants. Proc. Beltwide cotton improvement conference. Ed. National cotton council. San Antonio, USA, 6-7 January 1995, 513-514.

Mergeai G, Vroh bi I, Baudoin JP, du Jardin P. (1997). Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to assist wide hybridization in cotton. *In* : Cotton Biotechnology. YPS Bajaj (Ed). Springer verlag (sous presse).

Murray M, Thomson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res*.* **8** : 4321-4325.

Shuijin Z., Biling L (1993). Studies of the «glandless seeds-glanded plant» trait from *Gossypium bickii* into cultivated upland cotton (*G. hirsutum). Coton Fibres Trop*. **48**, 195-199.

Stewart JMcD, Hsu CL (1977). In-ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* **137**: 113-117.

Vroh bi Irié, Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., du Jardin P. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* **115**, 205 - 206.

Vroh bi Irié, du Jardin P., Mergeai G., Baudoin J.-P. (1997). Optimisation et application de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dans un programme de sélection récurrente chez le cotonnier (*Gossypium* spp.). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **1**, 142-150.

**Remerciements**

Ce travail a été financé par la convention 2.4565.95 du « Fonds de la recherche fondamentale collective » de Belgique.